

INDAGINI SULLA MICROBIOLOGIA DEL COMPLESSO CARSICO RIO STELLA-RIO BASINO

DAVID BIANCO¹, THEA MONDINI², GIUSEPPE RIVALTA³,
DIANA I. SERRAZANETTI⁴, DAVIDE GOTTARDI⁴

Batteri, muffe, attinomiceti... e più complessi esseri, formano una Giungla Microbiologica nella quale amici e nemici, saprofiti e parassiti, simbionti e antagonisti, si contendono, fra loro e con le piante, lo spazio vitale e il nutrimento...

Thom 1938 (da FLORENZANO 1972)

Riassunto

Lo studio delle popolazioni microbiche degli ambienti sotterranei è di grande interesse poiché queste costituiscono la base energetica e quindi trofica delle grotte. Nel presente lavoro sono contenuti i primi risultati di uno studio microbiologico riguardante il complesso carsico Stella-Basino. Questa ricerca rientra nel più ampio Progetto Life – Gypsum di durata quinquennale. Grazie alle moderne tecniche di amplificazione genetica è stato possibile raggiungere risultati di identificazione batterica molto precisi. I primi dati sono stati confrontati con quelli ottenuti con metodi tradizionali nella Grotta Novella e Risorgente del Farneto (Gessi Bolognesi) da noi eseguiti negli anni precedenti. Solo alla fine di questa complessa indagine sarà possibile avere un data- base completo sulla microbiologia di questa grotta. Attualmente i risultati sono confortanti per quello che concerne lo stato di salute del torrente ipogeo, infatti sono state identificate specie tipicamente ambientali.

Parole chiave: Popolazioni batteriche, protein chains reaction, indice microbico dell'aria, endemismi.

Abstract

The study of microbial associations in the underground environment is extremely interesting because they are the energetic and thus trophic base for caves. In the present paper the first studies related to the Stella-Basino karst system are reported. This research is part of the wider Life-Gypsum project. Thanks to the modern technique of genetic amplification it was possible to achieve a good degree of bacteria identification. These first data are compared with those obtained with traditional methods in the Novella Cave and in the Farneto spring (in the Gypsum outcrop near Bologna) a few years ago. At the end of the research a complete microbiological data-base of this cave will be available. At the present stage the first results suggest that the environment of the underground river is rather good.

Keywords: Bacteria, protein chains reaction, air microbial index, endemisms.

Introduzione

L'ecologia del mondo sotterraneo dipende in massima parte dalla presenza di microrganismi le cui attività biologiche, che svolgono nei substrati, rendono, anche questo

durissimo habitat, adatto alla vita degli organismi superiori. Come sempre accade, è l'ambiente che orienta e seleziona l'azione dei microrganismi. In genere nel suolo, per azione proprio dei batteri, funghi

¹ Parco Regionale dei Gessi Bolognesi e dei Calanchi dell'Abbadessa - Servizio Ambiente Parco

² Gruppo Speleologico Bolognese / Unione Speleologica Bolognese - Ricercatrice Parco Gessi Bolognesi

³ Gruppo Speleologico Bolognese / Unione Speleologica Bolognese - Responsabile Scientifico Parco Gessi Bolognesi

⁴ Settore di Microbiologia del Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Bologna

ecc., avviene un'ossidazione biologica pari all'80-90% rispetto a quella totale (JOHNSON, 1967), da cui si evince l'importantissima azione di questi antichissimi esseri viventi. Nell'ambiente cavernicolo sono i batteri autotrofi che costituiscono la base della piramide ecologica cavernicola, come ad esempio i Solfobatteri (dove le condizioni ambientali lo consentono) che metabolizzano lo zolfo (Fig. 1).

Normalmente la loro attività si svolge nei primi centimetri di superficie del suolo, ma essendo la grotta una specie di "invaginazione", un prolungamento della stessa, la regola viene rispettata.

I fattori che caratterizzano un habitat, determinano i tipi di specie ed il loro numero, ossia la biodiversità microbiologica specifica: in altri termini si realizza una interdipendenza tra substrato e popolamento microbico. Il substrato è prevalentemente minerale (inorganico), ma l'azione biologica svolta dai microrganismi su di esso (per dirla con JACKS, 1963) "...è così vitale per la continuazione della vita, quanto la fotosintesi".

Nelle grotte, dove sono assenti le piante verdi, il numero delle popolazioni batteriche è relativamente inferiore a causa dell'assenza di uno strato rizosferico (zona in cui generalmente si ha un'alta concentrazione microbiologica), ma, viceversa, i popolamenti fungini, per lo più microscopici, sono molto abbondanti in specie e numero.

Un importantissimo veicolo di trasporto di sostanza organica, nell'ambiente ipogeo, è l'acqua sotto forma di torrenti, stillicidio, gocce di condensazione, laghi e pozze (Fig. 2).



Fig. 2 - Bacilli *Pseudomonas*.

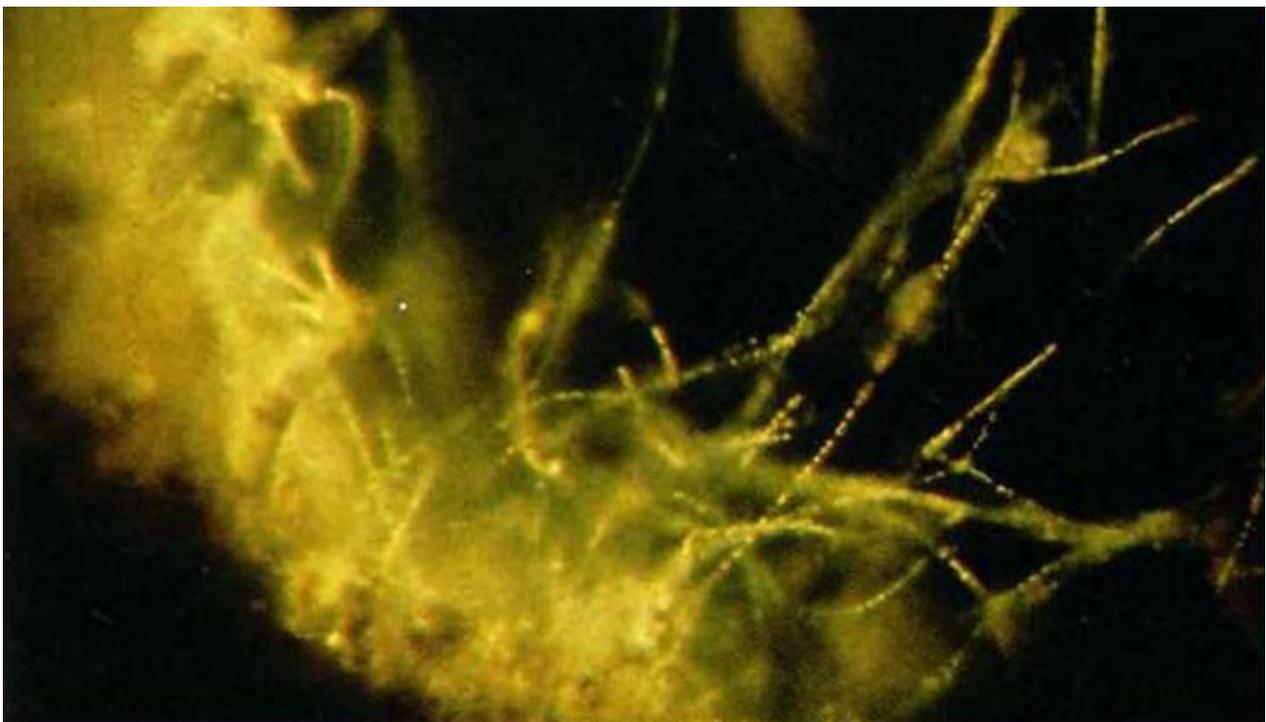


Fig. 1- Colonia di Solfobatteri con i tipici granelli di zolfo.

Per verificare lo stato di salute microbiologico delle grotte, è proprio attraverso il campionamento dell'acqua ipogea che si ottengono i risultati necessari. In essa si ritrova la "Storia" sia del mondo sotterraneo che di quello esterno. I noti problemi prodotti dall'inquinamento, sono "trascritti" nel fango e nelle superfici dove regna il buio totale. Questo tipo di monitoraggio, mediato dalla Microbiologia ambientale di "superficie", è ancora in fase di sperimentazione, ma con le moderne tecniche di amplificazione genetica si stanno ottenendo importanti risultati.

Il Complesso Rio Stella-Rio Basino

Si tratta di una grotta di attraversamento lunga circa un chilometro e mezzo e che prosegue all'esterno in una splendida ed interessantissima forra. Il torrente (Rio Stella), che diventa ipogeo all'incontro con le formazioni gessose, proviene da una zona dove, oltre a coltivazioni sono presenti anche attività zootecniche e case sparse. Il tratto ipogeo che prende il nome di Rio Basino riceve le acque da due affluenti di cui uno proveniente dall'Abisso Bentini (Monte Mauro) ed un secondo da Monte della Volpe attraverso un sifone, oltre allo stesso Rio Stella.

Nel suo complesso il bacino imbrifero che alimenta il sistema carsico appare in buone condizioni di naturalità, stante un utilizzo del suolo assai limitato, ad eccezione delle attività agro-pastorali presenti nella Valle Cieca del Rio Stella: le popolazioni microbiche e fungine presenti, dovrebbero essere tipicamente legate al suolo in condizioni di naturalità e seminaturalità (ad es. la gestione a bosco ceduo).

Tra le principali minacce per i sistemi carsici vanno ricordati gli impatti derivanti dalle molteplici attività in superficie: scarichi fognari, spandimenti, uso di fertilizzanti e pesticidi, lavorazione dei terreni, sovrappassaggio, presenza di infrastrutture viarie, ecc. L'impatto effettivo sarà in relazione alla sua entità e qualità ma anche alle caratte-

ristiche del sistema carsico: l'effetto varierà infatti anche in base alla portata del corso d'acqua ipogeo, come noto assai variabile (oltre 300 l/sec in Maggio e < 3 l/sec in Agosto).

La conoscenza delle dinamiche e caratteristiche ideologiche naturali e/o indotte dalla presenza dell'uomo risultano fondamentali per la gestione di questa area carsica e potranno orientare l'Ente Parco sia a stabilire apposite limitazioni o modalità di svolgimento di pratiche e attività (ad es. gli spandimenti), sia a programmare interventi sul territorio (ad es. potenziando la fascia vegetale "tampono" nel tratto del Rio Stella a monte dell'inghiottitoio).

Il Complesso Rio Stella-Rio Basino ed il Progetto Life "Gypsum"

La Risorgente del Basino - uno degli ambienti più importanti del Parco Regionale della Vena dei Gessi Romagnola e del Sito Natura 2000 omonimo - è la più significativa sorgente carsica sui Gessi Messiniani presente in Regione e merita un particolare interesse sotto molteplici aspetti, compresa l'ecologia microbica delle acque.

Nel 2010 ha preso avvio il progetto Life + 08NAT/IT/000369 "*Gypsum: tutela e gestione di habitat associati alle formazioni gessose dell'Emilia-Romagna*", coordinata dal Parco Regionale dei Gessi Bolognesi e Calanchi dell'Abbadessa.

Gli affioramenti selenitici sono ricchi di biodiversità e storia naturale; si tratta di ambienti piuttosto rari, vulnerabili e fragili su cui sono state individuate Aree Protette di vario tipo (Parchi Naturali, Riserve, Siti di Importanza Comunitaria).

L'importanza naturalistica degli affioramenti gessosi della collina dell'Emilia e della Romagna è ben nota: si tratta di veri *hot spot* per la biodiversità e geodiversità regionale, in cui si riscontrano habitat e specie di grande interesse europeo. Il progetto si concentra su una serie di habitat (grotte e comunità vegetali associate agli affioramenti gessosi) e su diverse specie di pipistrelli che

¹ SIC IT4030017 Ca' del Vento, Ca' del Lupo, Gessi di Borzano, SIC IT4030009 Gessi Triassici, SIC-ZPS IT4050001 Gessi Bolognesi, Calanchi dell'Abbadessa, SIC IT4050027 Gessi di Monte Rocca, Monte Capra e Tizzano, SIC-ZPS IT4070011 Vena del Gesso Romagnola, SIC IT4090001 Onferno.

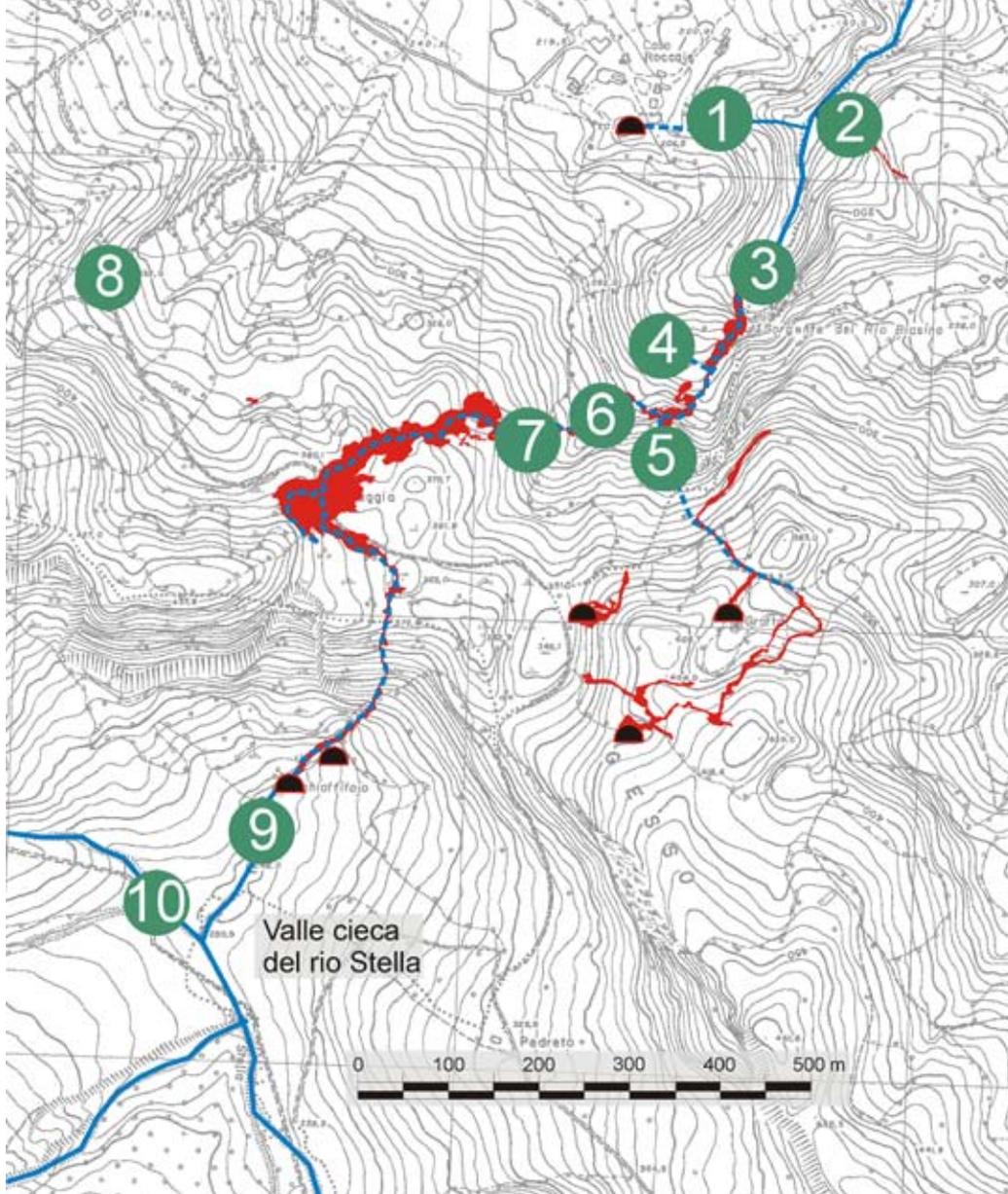


Fig. 3 – Localizzazione dei punti di prelievo utilizzati per il presente studio.

sono presenti in sei Siti Natura 2000¹, analizzando le minacce alla conservazione del patrimonio naturale e proponendo interventi ed azioni mirati ad una gestione sul medio e lungo termine di questi fragili ecosistemi. Il progetto rivolge una particolare attenzione agli acquiferi carsici, individuando 30 stazioni su cui verrà effettuato un monitoraggio pluriennale (5 anni) sui principali parametri chimico-fisici e microbiologici. Tale azione coinvolge due diversi Dipartimenti dell'Università di Bologna (Dipartimento di Scienze della Terra e Geologico-Ambientali, referente il Prof. Jo De Waele, ed il Dipartimento di Scienze degli Alimenti, referente la Prof.ssa Elisabetta Guerzoni) e conta anche sull'indispensabile apporto del mondo speleologico nella fase di rilevamento dati. Vista la sua evidente importanza, il sistema Stella-Basino è stato da subito inserito

negli acquiferi da sottoporre al monitoraggio del Progetto *Gypsum*, individuando numerosi punti di caratterizzazione.

All'avvio del Progetto Stella-Basino alcuni degli autori avevano già effettuato alcuni campionamenti presso i quattro principali punti (inghiottitoio, laminatoi, sifone e risorgente) dell'acquifero; il controllo delle acque mediante tecniche tradizionali (semina ed identificazione) aveva portato ad individuare un certo numero di specie sia batteriche che fungine ad habitat tipicamente ambientale, in altri termini, legate quindi al suolo o all'ambiente acquatico.

In seguito, grazie al Progetto *Life Gypsum*, tale azione preliminare di campionamento è stata sviluppata e ampliata, anche mediante la possibilità di impiegare più efficienti tecniche biomolecolari.

Scelta dei punti di campionamento

In base alle caratteristiche del bacino imbrifero, alla morfologia interna della cavità e allo sviluppo idrografico noto, per ottenere un miglior monitoraggio, sono stati iden-

tificati i seguenti punti (Fig.3):

- N° 1 Risorgente di Ca' Roccale (Grotta Nera)
- N° 2 Risorgente SEMPAL (Fig. 4)

Fig.4 - Prelievo alla risorgente SEMPAL (foto F. Grazioli).





Fig.5 - Prelievo nel punto di risorgenza del Rio Basino (foto F. Grazioli).



Fig.6 - Prelievo nel sifone del Rio Basino (foto F. Grazioli).

- N° 3 Risorgente Basino (Fig. 5)
- N° 4 Rio Basino - sifone (Fig. 6)
- N° 5 Rio Basino - Abisso Bentini
- N° 6 Rio Stella - Rio Basino, a monte dell'Ab.Bentini (Fig. 7)
- N° 7 Rio Stella - Rio Basino, a monte dell'Ab.Bentini.
- N° 8 Arrivo Acquedotto del topolino
- N° 9 Inghiottitoio del Rio Stella
- N°10 Rio laterale del Rio Stella

Le indagini microbiologiche, come già accennato, sono state affidate alla Sezione di Microbiologia del Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Bologna, diretto dalla Prof.ssa M. Elisabetta Guerzoni (Fig. 8). Le prime analisi sono state condotte dalla Dr.ssa Diana I. Serrazanetti.

Nuove tecniche per la microbiologia ambientale

Recentemente importanti tecniche di biologia molecolare sono state sviluppate per il monitoraggio e lo studio di campioni provenienti da acque, rocce e terreno. Queste tecniche permettono sia l'identificazione di microrganismi a livello di specie sia la verifica del pattern microbico di ogni campione, permettendo così una loro fondamentale discriminazione a livello ecologico (fingerprinting). In particolare la tecnica *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE) (Wu *et al.*, 2006) è emersa come uno strumento fondamentale per lo studio delle diverse ecologie dei campioni considerati. Il fingerprinting (impronta digitale del campione) proveniente da un'analisi con PCR-DGGE sarà utilizzato per caratterizzare i campioni a seconda dei microrganismi in esso presenti. Questa tecnica utilizza il gradiente di sostanze chimiche denaturanti (urea e formamide) in un gel di poliacrilamide andando così a separare i segmenti di DNA di uguale lunghezza, ma con diverse sequenze. Inoltre, il sequenziamento di specifiche regioni del DNA dei microrganismi (16S rRNA per i batteri, ITS, per lieviti e muffe) permette la loro identificazione a livello di specie, come precedentemente descritto. In questa prima fase della ricerca PROGETTO LIFE+ 08 NAT/IT/000369 "GYPSUM" la sezione di microbiologia, supervisionata



Fig. 7 - Prelievo lungo il corso ipogeo del Rio Basino (foto F. Grazioli).



Fig. 8 - Il laboratorio di Microbiologia della Prof. Guerzoni.

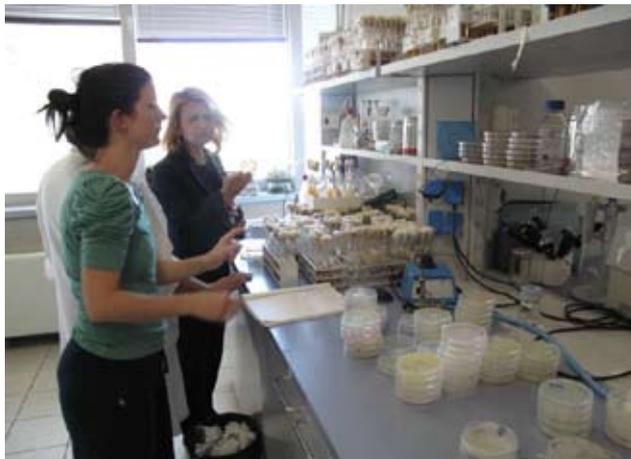
dalla Prof.ssa M. Elisabetta Guerzoni, si è occupata prevalentemente del settaggio dei protocolli di analisi, dell'analisi dei primi campioni, dell'isolamento e dell'identificazione dei microrganismi (batteri, muffe e lieviti) in essi presenti.

Settaggio dei protocolli di Analisi delle acque prelevate

Materiali e metodi

- Prelievo dei campioni

Il primo step è stato quello di identificare il



metodo più idoneo per il prelievo dei campioni. I campioni di acqua sono stati prelevati, sterilmente, dalle grotte in diversi siti di monitoraggio, in quantità di 500 ml e posti in bottiglie sterili. I campioni così ottenuti sono stoccati a 4°C fino al momento dell'analisi. Il tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi non deve superare i 7 giorni.

Campionamento, isolamento e caratterizzazione dei microrganismi

I microrganismi presenti nelle acque (batteri, lieviti e muffe) sono stati determinati tramite metodo colturale con conteggio in piastra (Fig. 9). I campioni sono stati piastrati in due diversi terreni idonei per il conteggio sia della carica microbica totale (R2A) che per il conteggio dei coliformi totali e fecali (VRBA, Oxoid) (Fig. 10).

Fig.9 - Il lavoro sui campioni del Basino nel laboratorio di Microbiologia Univ. di Bologna.

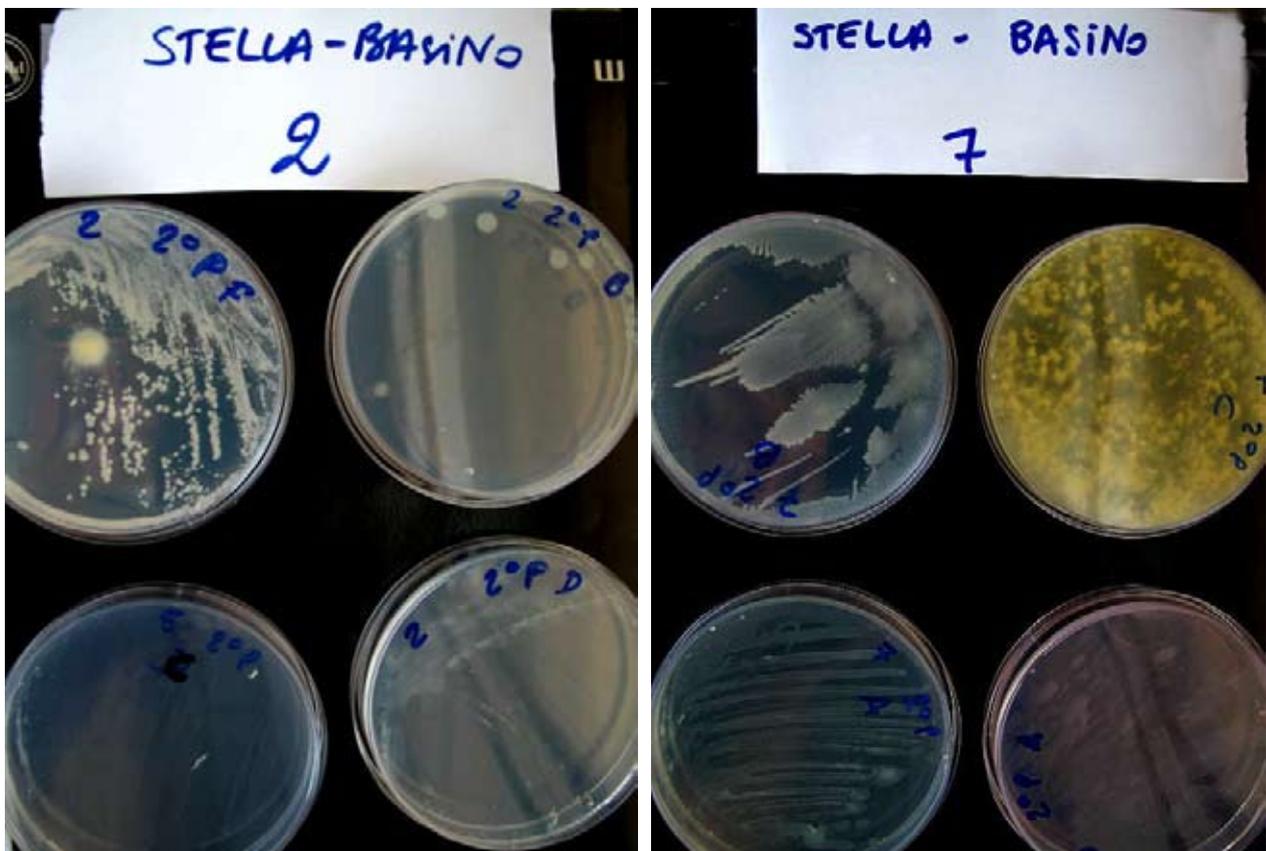


Fig. 10 - Piastre con colonie isolate del Basino.

Composizione del terreno R2A (1 litro)

(Wu *et al.*, 2006):

- Estratto di lievito 0.5 g
- Peptone 0.5 g
- Idrolizzato acido di caseina 0.5 g
- Destrosio 0.5 g
- Amido solubile 0.5 g
- Di potassio fosfato 0.3 g
- Glucosio 2.5 g
- Agar 18 g

Le **modalità di piastramento** sono riassunte in Fig.11.

Isolamento e stoccaggio dei microrganismi presenti

I microrganismi (lieviti, batteri e muffe) con morfologie differenti e rappresentativi dei diversi campioni sono stati isolati e purifi-

cati in R2A e in TSA (Oxoid). Verificata la purezza a seguito di analisi al microscopio i microrganismi sono stati stoccati in a -20°C in terreno liquido più glicerolo (20%) e in becco di clarino in terreno solido.

Estrazione del DNA da colture pure

Il DNA dei microrganismi puri, isolati dalle acque di stillicidio presenti nelle diverse grotte e nei diversi siti di prelievo, è stato isolato tramite il kit Instagene Matrix (Bio-rad) e successivamente stoccato a -20°C fino all'identificazione.

Identificazione dei batteri isolati (primers e amplificazione PCR)

Il segmento 16SrDNA (per l'identificazione di batteri) è stato amplificato con i primers descritti in Tab.1.

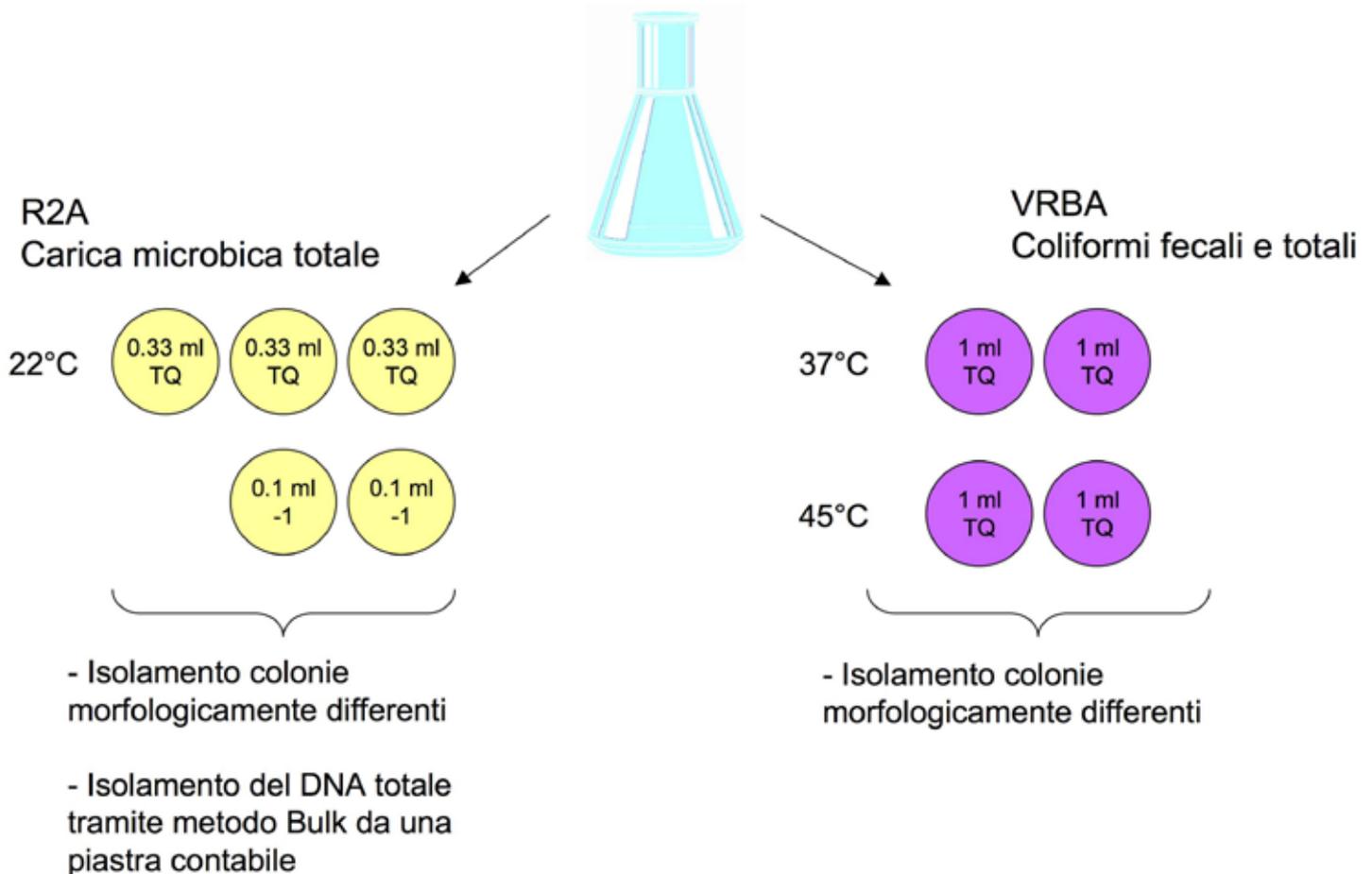


Fig. 11 - Schema di campionamento, conteggio e isolamento dei campioni di acque di stillicidio.

NOME	SEQUENZA	FUNZIONE
GM5-GC	CCTAC GGGAGGCAGCAG	BACTERIAL rDNA
907RM	CCGTC AATTCMTTGTAGTTT	BACTERIAL rDNA
ARC344F-GC	ACGGGGYGCAGGCGCGA	ARCHAEAL rDNA
ARC907R	GTGCTCCCGCGCCAATTCCT	ARCHAEAL rDNA
CYA781R	GACTACTGGGGTATCTAATCCCWATT	FOR CYANOBACTERIAL AND CHLOROPLAST rDNA
CYA781F	GACTACTGGGGTATCTAAYCCCWTT	FOR CYANOBACTERIAL AND CHLOROPLAST rDNA
EUBf933	GCACAAGCGGTGGAGCATGTGG	SPECIFIC FOR UNIVERSALLY CONSERVED BACTERIAL 16SrDNA SEQUENCES
EUBr1387	GCCCGGGAACGTATTCACCG	SPECIFIC FOR UNIVERSALLY CONSERVED BACTERIAL 16SrDNA SEQUENCES

Tab. 1 - **Primers** utilizzati per l'identificazione dei batteri isolati dalle acque di stitilicidio.

Le condizioni di PCR testate sono state sviluppate in accordo con Wu *et al.*, 2006. La riuscita della PCR è stata confermata tramite corsa su gel di agarosio (1,5%). Il template è stato purificato tramite QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e sequenziato presso il laboratorio BMR Genomics (Padova).

Le sequenze sono state analizzate tramite il programma 4PEAKS (<http://www.mekentosj.com/4peaks/>). L'appaiamento delle sequenze con quelle presenti nei database internazionale è stato sviluppato sul sito European Bioinformatic Institute (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html>) che ha permesso l'identificazione degli isolati a livello di specie (Fig. 12).

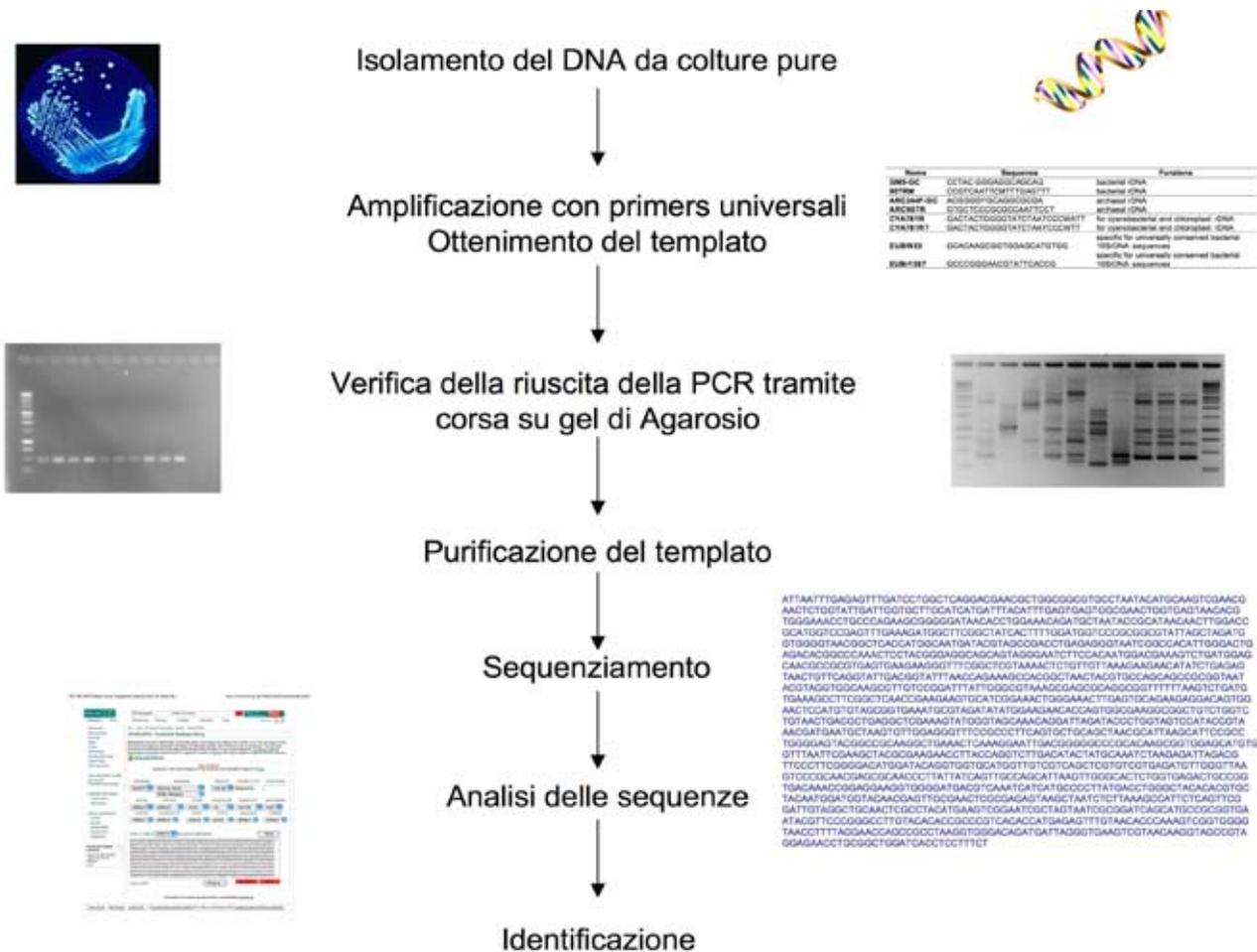


Fig. 12 - Schema di identificazione microbica tramite metodi molecolari.

Estrazione del dna totale per analisi DGGE

Per l'estrazione del DNA totale sono stati testati due diversi metodi.

Il primo è stato sviluppato tramite filtraggio di 250 ml di acqua con filtro da 0.2 mm. Il filtro è stato utilizzato come matrice da cui estrarre il DNA totale in accordo con GONZALEZ-TORIL *et al.*, 2003. Il DNA totale così ottenuto è stato amplificato con i primers EUBf933-GC e EUBr1387 e fatto correre su gel DGGE (40%-60%).

Il secondo protocollo testato è stato sviluppato sulla base del metodo Bulk proposto da ERCOLINI *et al.*, (2001). Questo metodo di analisi permette la caratterizzazione della comunità microbica coltivabile tramite PCR-DGGE, che comunemente ha un limite di rilevabilità di 104 UFC/ml, e che nelle acque fin ora analizzate si è dimostrato intorno a 102 UFC/ml. Sospensioni cellulari Bulk (1 ml) (ERCOLINI *et al.*, 2001), da piastre contabili in R2A, sono state utilizzate per la successiva estrazione del DNA totale come descritto da VERNOCCHI *et al.*, 2008. La PCR-DGGE è stata sviluppata con i primers EUBf933-GC e EUBr1387 e i campioni sono stati fatti correre su gel di acrilamide con una percentuale denaturante di 40%-60% al fine di determinare la biodiversità dei campioni stessi.

Per meglio comprendere la complessità dell'Ecosistema grotta dello Stella –Basino si sono effettuati confronti con altre cavità sottoposte al medesimo monitoraggio, sempre formati in Gessi Messiniani, in Emilia-Romagna (Parco dei Gessi Bolognesi), già da vari anni interessate a questo genere di ricerca (RIVALTA & LAMBERTINI, 2005) pur con sistemi tradizionali e per lo più indirizzati verso lo studio dei microrganismi dispersi nell'aria delle grotte (I.M.A.= Indice Microbico dell'Aria).

Confronti dei conteggi in piastra

Dalle Tabelle 2 e 3 si può osservare come i ceppi coltivati nelle grotte bolognesi ed al Basino, si sviluppano solo a 22° C (bassa temperatura): questo costituisce un elemento significativo che indica la presenza di condizioni ambientali ottimali.

SITO PRELIEVO	VRBA 37°C LOGCFU/ML	VRBA 45°C LOGCFU/ML	R2A 22°C LOGCFU/ML
RISORG.FARNETO	0	0	2.6
1 SOTTO POZZO LAMA	0	0	1.5
3 SALA SOPRA POZ.	0	0	0
4 LAB.BIOSPEL.	0	0	2.2
5 SOTTO CAMINO	0	0	1.8

Tab. 2 - Ecologia microbica Grotta Novella e valle Farneto (= Risorgente)(Per "CFU/ml" si intende internazionalmente "Unità Formanti Colonie per ml").

SITO PRELIEVO	VRBA 37°C LOGCFU/ML	VRBA 45°C LOGCFU/ML	R2A 22°C LOGCFU/ML
1	0	0	2.38
2	0	0	2.98
3	0	0	2.97
4	0	0	2.89
5	0	0	N.C.
6	0	0	2.78
7	0	0	1.96
8	0	0	2.82
9	0	0	2.73
10	0	0	2.42

Tab. 3 - Ecologia microbica della grotta Rio Stella- Rio Basino.

Identificazione dei ceppi isolati e purificati:

Da ogni piastra ottenuta, a seguito del campionamento, sono state isolate un minimo di 8 colonie, con morfologie differenti. Questi ceppi sono stati purificati tramite semina in piastra fino all'ottenimento di colonie pure rappresentative di ogni ceppo.

Una previa identificazione basata sulla morfologia delle colonie rappresentative di ogni campione (compresi quelli provenienti dal Rio Stella-Rio Basino) ha identificato i seguenti gruppi microbici:

- *Bacillus* spp.
- *Pseudomonas* spp.
- *Sarcina* spp.
- *Chromatium/Halochromatium*
- *Roseospira*
- *Actinomyces*

Inoltre, in tutti i campioni sono stati identificati microrganismi appartenenti alle specie *Bacillus firmus* e *Bacillus megaterium*. Questi batteri sono stati facilmente identificati grazie alla loro capacità di produrre esopolisaccaridi, polisaccaridi capsulari e carbonato di calcio.

Le identificazioni (Fig. 13) sono state sviluppate tramite PCR e sequenziamento della regione 16S rDNA con i primers riportati in tabella 1. I risultati delle prime identificazioni a livello di specie sono riportati in tabella 5.

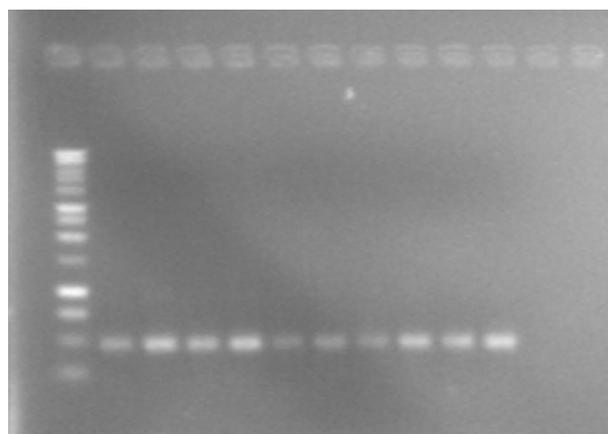


Fig. 13 - DNA amplificato con primers EUBf933 e EUBr1387 e corso su gel di agarosio 1,5%.

SIGLA CAMPIONE	FONTE DI ISOLAMENTO	SPECIE	PERCENTUALE DI SIMILARITÀ
1 - 1A	SITO 1 GROTTA NOVELLA	UNCULTURED <i>STENOTROPHOMONAS</i> O <i>XANTOMONAS</i>	99%
1 - 1B	SITO 1 GROTTA NOVELLA	UNCULTURED <i>STENOTROPHOMONAS</i> SP. <i>XANTHOMONAS</i>	99%
1 - 2A	SITO 1 GROTTA NOVELLA	<i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	99%
4 - 2	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA</i>	99%
4 - 3	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>RAHNELLA AQUATILIS</i>	99%
4 - 4	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>PSEUDOMONAS TRIVIALIS</i> O <i>FLUORESCENS</i>	98%
4 - 6	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>PSEUDOMONAS TRIVIALIS</i> O <i>FLUORESCENS</i>	99%
4 - 7A	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>PSEUDOMONAS TRIVIALIS</i> O <i>FLUORESCENS</i>	99%
4 - 7B	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>PSEUDOMONAS TRIVIALIS</i> O <i>FLUORESCENS</i>	98%
4 - 8	SITO 4 GROTTA NOVELLA	<i>PSEUDOMONAS TRIVIALIS</i> O <i>FLUORESCENS</i>	99%
VALLE 2	RISORG. FARNETO	<i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	99%
VALLE 4	RISORG. FARNETO	<i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	99%

Tab. 5 - Primi microrganismi (batteri) identificati tramite sequenziamento della regione 16S rDNA provenienti dai Gessi Bolognesi.

Per quanto riguarda l'estrazione del DNA totale dei campioni al fine di corse elettroforetiche su gel di acrilamide per lo studio della popolazione microbica e della sua evoluzione il protocollo di estrazione sviluppato tramite filtraggio non è risultato funzionale allo scopo della caratterizzazione dei campioni di acque di stillicidio prelevati in diversi siti speleologici nelle grotte del parco dei gessi bolognesi. Per questo il metodo Bulk è stato scelto per l'analisi dei successivi campioni. Ancora una volta si precisa che questa ricerca è appena all'inizio e che i risultati riguardanti il complesso Rio Stella-Rio Basino saranno argomento di un futuro lavoro, attualmente in corso d'opera. Lo stesso dicasi per lo studio dei Miceti microscopici, sempre molto abbondanti in numero e specie.

Nota su un'analisi chimica dell'acqua del Rio Basino

Nel Maggio 2009, il Gruppo Speleologico Centotalpe effettuò dei campionamenti di acqua nel corso ipogeo del Rio Basino. Questi campioni furono analizzati dall'ARPA, nel laboratorio di Bologna da parte del chimico Dr.ssa Cristina Lea Barbieri.

In sintesi i risultati ottenuti si possono così riassumere:

I metodi utilizzati sono stati l'ISTISAN e metodiche UNI e APAT-IRSA CNR.

Ancora una volta occorre precisare che i "valori di riferimento" sono quelli previsti dalle Acque potabili (DPR n.236/88 e D.Lgs. 31/2001) poiché per le campionature ipogee mancano ancora informazioni normative precise.

L'acqua è ovviamente ricca di Solfato (1262 mg/l – v. rif. 250 mg/l) per la dissoluzione del gesso.

Dall'analisi si evince l'assenza, o per lo meno la presenza di quantità non significative di ioni nitrato (2 mg/l) e nitrito (>0,02 mg/l) il che fa supporre una bassa concentrazione batterica.

Concludendo si può affermare che questa indagine chimica concorda con quelle più recenti microbiologiche: nel Basino non sembra esistere al momento un problema di inquinamento batterico.

È necessario, tuttavia, ricordarsi che questi pochi dati devono venir confermati da molte altre analisi che saranno effettuate nei prossimi anni.

Conclusioni

Comprendere le caratteristiche chimiche e microbiologiche delle grotte dei Gessi emiliano-romagnoli è fondamentale non solo per aumentare le conoscenze di un ecosistema peculiare e per migliorare la loro tutela, ma anche per incrementare le *performances* dei processi biotecnologici finalizzati alla definizione di particolari "endemismi" e di particolari funzioni dei microrganismi isolati. La crosta di gesso delle grotte è un sistema ideale per lo studio della biodiversità microbiologica (sia genotipica che fenotipica) generalmente variabile in funzione delle caratteristiche dell'ecosistema. In questa situazione geologica si può parlare di ambienti estremi dove in alcuni casi la concentrazione di sali è elevata e sono presenti sia gradienti di luce che di ossigeno. L'obiettivo di questo progetto è quello di creare un modello funzionale che possa descrivere e caratterizzare l'ecosistema considerato. Le grotte che sono state analizzate, e che saranno ulteriormente studiate nel corso dei prossimi 5 anni del progetto GYPSUM, saranno soggette, a livello biologico e chimico, a delle variazioni direttamente dipendenti dalle variazioni climatiche e dalle eventuali contaminazioni antropiche. Per questo è importante creare dei protocolli veloci e ottimizzati, finalizzati alla rapida caratterizzazione dei campioni stessi.

Da un punto di vista della qualità delle acque occorre precisare che certamente i valori ottenuti sono ottimali per la Grotta Novella (Gessi Bolognesi) e che costituisce un "punto 0" sia per la sua posizione topografica che per le decine di analisi che vi sono state condotte da almeno vent'anni (pur con metodi tradizionali microbiologici), mentre per il complesso Stella-Basino, i risultati al momento sono buoni, come confermato anche da prime analisi chimiche effettuate.

Bibliografia

- ERCOLINI, D., MOSCHETTI, G., BLAIOTTA, G., COPPOLA, S., (2001), *The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of Natural Whey Cultures for water-buffalo Mozzarella cheese production: bias of "culture dependent" and "culture independent" approaches*, Syst. Appl. Microbiol. 24, pp. 610–617.
- FLORENZANO G., (1972), *Elementi di Microbiologia del terreno* - REDA
- GÓNZALEZ-TORIL, E., GÓMEZ, F., RODRÍGUEZ, N., FERNÁNDEZ-REMOLAR, D., ZULUAGA, J., MARÍN, I., AMILS, R., (2003), *Geomicrobiology of the Tinto River, a model of interest for biohydrometallurgy*, Hydrometallurgy. 71, pp. 301–309.
- JACKS G.V., (1963), *The biological nature of soil productivity*, Soils and Fertil., 26, pp. 147-150.
- JOHNSON M.J., (1967) Impact Sci. Soc. UNESCO, 17, pp. 295-309.
- RIVALTA. G., LAMBERTINI C., (2005), *Ricerche integrate sull'ecosistema grotta: Microbiologia*, Sottoterra 121, pp. 46-52.
- VERNOCCI, P., NDAGIJIMANA, M., SERRAZANETTI, D. I., GIANOTTI, A., VALLICELLI, M., GUERZONI, M. E., (2008), *Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli*. Food Chem. 108, pp. 1217–1225.
- WU, Q., ZHAO, X. H., ZHAO, S. Y., (2006), *Application of PCR-DGGE in Research of Bacterial Diversity in Drinking Water*. Biomedical and Environmental Sciences. 19, pp. 371-374.